



**ZytoFast**

**HPV High-Risk (HR) Types Probe**

(Digoxigenin-labeled)

REF T-1140-400

Σ 40 (0,4 ml)

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) ile insan papilloma virüsü (HPV) tip 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 DNA'sının kalitatif tespiti için

4250380P172R3



In vitro diagnostik tıbbi cihaz

IVDR (AB) 2017/746'ya göre

### 1. Hedeflenen amaç

ZytoFast High-Risk (HR) Types Probe (PF46), servikal karsinom ve orofaringeal skuamöz hücreli kanser (OSCC) gibi formalinle fikse edilmiş, parafine gömülü örneklerde kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) yoluyla insan papilloma virüsü (HPV) tip 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 DNA'sının kalitatif tespiti için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Probun, aşağıdakilerle birlikte kullanılması amaçlanmıştır ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Ürün No. T-1063-40).

Ürün sadece profesyonel kullanım için tasarlanmıştır. Ürünün kullanıldığı tüm testler sertifikalı, lisanslı bir anatomik patoloji laboratuvarında bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında kalifiye personel tarafından gerçekleştirilmelidir.

Prob, servikal karsinom ve OSCC'nin ayırıcı tanısına yardımcı olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır ve terapötik önlemler yalnızca test sonucuna göre başlatılmamalıdır.

### 2. Test prensibi

Kromojenik *in situ* hibridizasyon (CISH) tekniği, hücre preparatlarında spesifik nükleik asit dizilerinin tespit edilmesini ve görüntülenmesini sağlar. CISH problemleri olarak adlandırılan hapten-ışaretili nükleotid fragmanları ve preparatlardaki tamamlayıcı hedef dizileri birlikte denatüre edilir ve daha sonra hibridizasyon sırasında tavlmasına izin verilir. Daha sonra, spesifik olmayan ve bağlanmamış prob parçaları sıkı yıkama adımları ile uzaklaştırılır. İşaretili probun dubleks oluşumu, ikincil polimerize enzim-konjuge antikorlar tarafından tespit edilen birincil (ışaretsiz) antikorlar kullanılarak görselleştirilebilir. Kromojenik substratlarla enzimatik reaksiyon daha sonra renkli çöktürmelerin oluşmasına yol açar. Çekirdeğin bir nükleer boya ile karşı boyanmasından sonra, hibridize prob parçaları ışık mikroskobu ile görselleştirilir.

### 3. Sağlanan reaktifler

ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe oluşmaktadır:

- HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82 proteinleri E6, E7 ve/veya L1'i kodlayan DNA dizilerini hedefleyen HPV tip 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66/68/82'e özgü digoksigenin işaretli oligonükleotidler (~ 2,2 ng/μl). Prob ayrıca enfeksiyonun bazı aşamalarında ifade edilen E6, E7 ve/veya L1 proteinlerinin ilgili RNA dizilerini de hedefler.
- Formamid bazlı hibridizasyon tamponu

ZytoFast HPV High-Risk (HR) Types Probe iki boyutta mevcuttur:

- T-1140-40: 0,4 ml (her biri 10 μl'lik 40 reaksiyon)

### 4. Gerekli ancak sağlanmayan malzemeler

- ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB (Ürün No. T-1063-40)
- Pozitif ve negatif kontrol numuneleri
- Mikroskop lamaları, pozitif yüklü
- Su banyosu (55 °C, 98 °C)
- Hibridizatör veya sıcak plaka
- Hibridizasyon fırınında hibridizatör veya nem odası
- Ayarlanabilir kalibre edilmiş pipetler (10 μl, 100 μl, 1000 μl)
- Boyama kavanozları veya banyoları
- Zamanlayıcı
- Kalibre edilmiş termometre
- Etanol veya reaktif alkol
- Ksilen
- Metanol %100
- Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) %30
- Deiyonize veya damıtılmış su
- Kapaklı Klipsler (22 mm x 22 mm, 24 mm x 32 mm)
- Kauçuk çimento, örneğin Fixogum Rubber Cement (Ürün No. E-4005-50/-125) veya benzeri
- Yeterince bakımı yapılmış ışık mikroskobu (100-200x)

### 5. Depolama ve taşıma

2-8 °C'de dik konumda saklayın. Kullanımdan hemen sonra saklama koşullarına geri döndürün. Etiket üzerinde belirtilen son kullanma tarihinden sonra reaktifleri kullanmayın. Ürün, uygun şekilde kullanıldığında etikette belirtilen son kullanma tarihine kadar stabildir.

### 6. Uyarılar ve önlemler

- Kullanmadan önce kullanım talimatlarını okuyun!
- Reaktifleri son kullanma tarihi geçtikten sonra kullanmayın!
- Bu ürün sağlığa zararlı ve potansiyel olarak bulaşıcı maddeler (düşük konsantrasyonlarda ve hacimlerde) içerir. Reaktiflerle doğrudan temastan kaçının. Uygun koruyucu önlemleri alın (tek kullanımlık eldivenler, koruyucu gözlükler ve laboratuvar giysileri kullanın)!
- Ürünle ilgili olarak meydana gelen her türlü ciddi olayı yerel yönetmeliklere uygun olarak üreticiye ve yetkili makama bildirin!
- Reaktifler ciltle temas ederse, cildi derhal bol miktarda suyla yıkayın!
- Profesyonel kullanıcılar için talep üzerine bir malzeme güvenlik bilgi formu temin edilebilir.
- Tekrar kullanıma açıkça izin verilmediği sürece reaktifleri tekrar kullanmayın!
- Hatalı sonuçlara yol açabileceğinden numunelerin çapraz kontaminasyonundan kaçının.
- Hibridizasyon ve yıkama adımları sırasında numunelerin kurumasına izin verilmemelidir.

**Tehlike ve önlem beyanları:**

Tehlikeyi belirleyen bileşen formamiddir.



Tehlike

|           |  |
|-----------|--|
| H351      | Kansere neden olduğundan şüpheleniliyor.                                       |
| H360FD    | Doğurganlığa zarar verebilir. Doğmamış çocuğa zarar verebilir.                 |
| H373      | Uzun süreli veya tekrarlı maruz kalma sonucu organlarda hasara neden olabilir. |
| P201      | Kullanmadan önce özel talimatları alın.  |
| P202      | Tüm güvenlik önlemleri okunup anlaşılardan elleçlemeyin.                       |
| P260      | Toz/duman/gaz/sis/buhar/sprey solumayın.                                       |
| P280      | Koruyucu eldiven/koruyucu giysi/göz koruması/yüz koruması kullanın.            |
| P308+P313 | Maruz kaldıysanız veya endişeliyseniz: Tıbbi tavsiye/müdahale alın.            |
| P405      | Depo kilitli.  |

**7. Sınırlamalar**

- *In vitro* diagnostik kullanım için.
- Sadece profesyonel kullanım içindir.
- Yalnızca otomatik olmayan kullanım içindir.
- Herhangi bir pozitif boyamanın klinik yorumu veya yokluğu, klinik öykü, morfoloji, diğer histopatolojik kriterler ve diğer tanısal testler bağlamında yapılmalıdır. CISH problemleri, reaktifleri, tanı panelleri ve boyalı preparatı üretmek için kullanılan yöntemler hakkında bilgi sahibi olmak kalifiye bir patolog/insan genetikçisinin sorumluluğundadır. Boyama, boyanmış slaytları gözden geçirmekten ve pozitif ve negatif kontrollerin yeterliliğini sağlamaktan sorumlu olan bir patolog/insan genetikçisinin gözetimi altında sertifikalı, lisanslı bir laboratuvarında yapılmalıdır.
- Numune boyaması, özellikle sinyal yoğunluğu ve arka plan boyaması, boyamadan önce numunenin kullanımına ve işlenmesine bağlıdır. Uygun olmayan fiksasyon, dondurma, çözündürme, yıkama, kurutma, ısıtma, kesit alma veya diğer numuneler veya sıvılarla kontaminasyon artefaktlara veya yanlış sonuçlara neden olabilir. Tutarsız sonuçlar, fiksasyon ve gömme yöntemlerindeki farklılıkların yanı sıra numune içindeki doğal düzensizliklerden de kaynaklanabilir.
- Prob yalnızca bölüm 3'te açıklanan sekansı tespit etmek için kullanılmalıdır. "Sağlanan reaktifler".
- Performans, bu kullanım talimatlarında açıklanan prosedürler kullanılarak doğrulanmıştır. Bu prosedürlerde yapılacak değişiklikler performansını değiştirebilir ve kullanıcı tarafından doğrulanmalıdır. Bu IVD, yalnızca bu kullanım talimatında açıklandığı şekilde amaçlanan kullanım kapsamında kullanıldığında CE sertifikasına sahiptir.

**8. Müdahale eden maddeler**

Aşağıdaki fiksatifler ISH ile uyumlu değildir:

- Bouin'in fiksatif
- B5 fiksatif
- Asidik fiksatifler (örn. pikrik asit)
- Zenker fiksatif
- Alkoller (tek başına kullanıldığında)
- Merkürük klorür
- Formaldehit/çinko fiksatif
- Hollande'in sabitleyicisi
- Tamponlanmamış formalin

**9. Numunelerin hazırlanması**

Numuneleri, cihazın kullanım talimatlarında açıklandığı şekilde hazırlayın. ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB.

**10. Cihazın hazırlık işlemi**

Ürün kullanıma hazırdır. Sulandırma, karıştırma veya seyreltme gerekmez. Probu hibridizasyon sıcaklığına (37 °C) getirin ve kullanmadan önce iyice karıştırın.

**11. Tahlil prosedürü****Numune ön işlemi**

İlgili ZytoFast CISH Implementation Kit kullanım talimatlarına göre numune ön işlemini (örn. mum alma, proteoliz) gerçekleştirin.

**Denatürasyon ve hibridizasyon**

1. Ön işlemden geçirilmiş her numuneye 10 µl prob pipetleyin.
  2. Örnekleri 22 mm x 22 mm lamel ile kaplayın (sıkışmış kabarcıklardan kaçının) ve lameli kapatın.
- Sızdırmazlık için kauçuk çimento (örn. Fixogum) kullanmanızı öneririz.*
3. Lamaları sıcak bir plakaya veya hibridizatöre yerleştirin ve örnekleri 75 °C'de 5 dakika boyunca denatüre edin.
  4. Lamaları bir nem odasına aktarın ve 37 °C'de 1 saat boyunca hibridize edin (örn. bir hibridizasyon fırınında).

*Hibridizasyon adımı sırasında numunelerin kurumaması çok önemlidir.*

**Hibridizasyon sonrası**

Hibridizasyon sonrası işlemleri (yıkama, tespit, karşı boyama, montaj, mikroskopi) ilgili ZytoFast CISH Implementation Kit kullanım talimatlarına göre gerçekleştirin.

**12. Sonuçların yorumlanması**

ZytoFast PLUS CISH Implementation Kit HRP-DAB kullanıldığında, hibridize Digoxigenin etiketli oligonükleotidler yabancı peroksidadı (HRP) ve DAB ile tespit edildiğinde kahverengi desen olarak görünür.

Çekirdekteki boyanma paterni, entegre HPV durumunda farklı nokta şekilli sinyaller olarak veya epizomal HPV durumunda güçlü ve homojen bir nükleer boyanma olarak gözlemlenebilir. HPV'nin RNA sekansları tespit edildiğinde sitoplazmik bir boyanma gözlenir.

**Lütfen unutmayın:**

- Sinyallerin görselleştirilmesi, en az 200 kat ila 630 kat büyütme arasında değişen bir dizi objektif kullanılarak gerçekleştirilmelidir. Epizomal boyama modelinin varlığı genellikle 200 kat büyütme bir objektifle net bir şekilde tespit edilirken, entegre modelin tespiti daha büyük bir büyütme, tercihen 630 kat gerektirir.
- Nekroz alanlarını, üst üste binen çekirdekleri, aşırı sindirilmiş çekirdekleri ve zayıf sinyal yoğunluğuna sahip çekirdekleri değerlendirmeyin.
- Negatif veya spesifik olmayan bir sonuç birden fazla faktörden kaynaklanabilir (bkz. Bölüm 16 "Sorun Giderme").
- Sonuçların doğru bir şekilde yorumlanabilmesi için, kullanıcı bu ürünü tanı prosedürlerinde kullanmadan önce ulusal ve/veya uluslararası kılavuzlara göre doğrulanmalıdır.

**13. Önerilen kalite kontrol prosedürleri**

İşlenmiş numunelerin ve test reaktiflerinin doğru performansını izlemek için, her tahlile dahili ve harici kontroller eşlik etmelidir. Dahili ve/veya harici kontroller uygun boyamayı gösteremezse, hasta numuneleriyle elde edilen sonuçlar geçersiz kabul edilmelidir.

**İç kontrol:** Net olmayan durumlarda, daha fazla açıklama için DNA Kontrol Problemleri kullanılmalıdır..

**Harici kontrol:** Onaylanmış pozitif ve negatif kontrol numuneleri.

## 14. Performans özellikleri

### 14.1 Analitik performans

Probuun performansı, ilgili IVD onaylı FISH probu ile karşılaştırılarak belirlenmiştir.

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| <b>Analitik hassasiyet:</b>     | 100% (95% CI 63.1 - 100)                       |
| <b>Analitik özgüllük:</b>       | 100% (95% CI 63.1 - 100)                       |
| <b>Çapraz Hibridizasyonlar:</b> | HPV tip 16, 26, 45, 52, 54, 58, 67, 68, 85, 97 |

### 14.2 Klinik performans

|                            |   |
|----------------------------|---|
| <b>Tanısal duyarlılık:</b> | <b>servikal karsinom:</b><br>100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. p16/ki67 ikili boyama<br><b>O SCC:</b><br>93.33% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC |
| <b>Teşhis özgüllüğü:</b>   | <b>servikal karsinom:</b><br>100% (95% CI 88.4 – 100.0) vs. p16/ki67 ikili boyama<br><b>O SCC:</b><br>81.82% (95% CI 76.9 – 97.3) vs. p16 IHC |

## 15. Bertaraf

Reaktiflerin imhası yerel yönetmeliklere uygun olarak gerçekleştirilmelidir.

## 16. Sorun Giderme

Kullanım talimatlarından herhangi bir sapma, düşük boyama sonuçlarına veya hiç boyama olmamasına neden olabilir. Daha fazla bilgi için lütfen [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) adresine bakın.

### Zayıf sinyaller veya hiç sinyal yok

| Olası neden                                      | Eylem   |
|--|---|
| Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış           | Pepsin inkübasyon süresini optimize edin, gerekirse artırın veya azaltın  |
| Buharlaştırma probu                              | Bir hibridizatör kullanırken, ıslak şeritlerin/su dolu tankların kullanılması zorunludur. Bir hibridizasyon fırını kullanıldığında, bir nem odasının kullanılması gereklidir. Ayrıca, hibridizasyon sırasında numunenin kurumasını önlemek için lamel, örneğin Fixogum ile tamamen kapatılmalıdır |
| Kromojenik substratın yetersiz hazırlanması      | Renk substratlarını damlatarak hazırlamak yerine bir pipet kullanın   |
| Karşı boyama süresi çok uzun                     | Pozitif boyama sinyallerini gizleyebileceğinden koyu karşı boyamadan kaçının  |
| Karşı lekenin mavileştirilmesi düzgün yapılmamış | Mavileştirme için soğuk akan musluk suyu kullanın; ılık veya sıcak su veya mavileştirme reaktifleri kullanmayın   |

### Sinyaller kaybolur veya birleşir

| Olası neden                                    | Eylem   |
|--|---|
| Uygun olmayan bir montaj çözümü kullanılmıştır | Yalnızca kitle birlikte verilen veya kullanım talimatlarında önerilen montaj solüsyonunu kullanın. Herhangi bir yabancı madde içermeyen solüsyonlar kullanın; lamel bandı kullanmayın |

### Düzensiz veya bazı kısımlarda sadece çok hafif lekelenme

| Olası neden             | Eylem   |
|-------------------------|---|
| Eksik mum alma          | Taze solüsyonlar kullanın; mum alma sürelerini kontrol edin               |
| Reaktif hacmi çok küçük | Reaktif hacminin doku alanını kaplayacak kadar büyük olduğundan emin olun |

### Tutarsız sonuçlar

| Olası neden  | Eylem  |
|--|--|
| Prob uygulamasından önce yetersiz kurutma  | Hava ile kurutmayı uzatın  |
| Pepsin, antikorlar ve/veya renk substratlarının uygulanmasından önce doku üzerinde çok fazla su/yıkama tamponu | Fazla sıvının doku kesitinden lekeleyerek veya lamdan sallayarak uzaklaştırıldığından emin olun. Az miktarda kalan su/yıkama tamponu testi etkilemez |
| Doku fiksasyonu ve gömme yöntemlerindeki varyasyonlar  | Sabitleme ve gömme yöntemlerini optimize edin  |
| Doku kesit kalınlığındaki değişimler   | Kesit almayı optimize edin   |

### Morfoloji bozulmuş

| Olası neden  | Eylem   |
|--|---|
| Hücre veya doku örneği uygun şekilde sabitlenmemiş | Sabitleme süresini ve fiksatifini optimize edin |
| Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış             | Pepsin inkübasyon süresini optimize edin        |

### Gürültülü arka plan

| Olası neden   | Eylem  |
|---|--|
| Hibridizasyon sırasında veya sonrasında herhangi bir zamanda kurumuş kesitler | Kesitlerin kurumasını önleyin; nem odası kullanın; lamelleri uygun şekilde kapatın |
| Uzatılmış substrat inkübasyon süresi  | Substrat inkübasyon süresini kısaltın  |
| Eksik mum alma  | Taze solüsyonlar kullanın; mum alma süresini kontrol edin                          |
| Proteolitik ön işlem düzgün yapılmamış  | Pepsin inkübasyon süresini optimize edin   |
| Hibridizasyondan önce oda sıcaklığına soğutulmuş slaytlar                     | Lamları hızlı bir şekilde hibridizasyon sıcaklığına aktarın                        |

### Çakışan sinyaller

| Olası neden                               | Eylem                                |
|---|--------------------------------------|
| Doku kesitlerinin uygun olmayan kalınlığı | 3-5 µm mikrotom kesitleri hazırlayın |

### Numune lam üzerinde yüzer

| Olası neden                    | Eylem                               |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| Proteolitik ön işlem çok güçlü | Pepsin inkübasyon süresini kısaltın |

## 17. Edebiyat

- Barodawala SM, et al. (2019) *Diagnostic cytopathology*.
- Kono T, et al. (2020) *Virology*.
- Wilkinson DG: In Situ Hybridization, A Practical Approach, Oxford University Press (1992) ISBN 0 19 963327 4.

**18. Revizyon**

| Revizyon | Değişikliğin açıklaması        |
|----------|--------------------------------|
| 2.1.1    | Onaylanmış kuruluş değişikliği |



[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)

En güncel kullanım talimatları ve farklı dillerdeki kullanım talimatları için lütfen [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com) adresine bakın.

Uzmanlarımız sorularınızı yanıtlamak için hazırdır.  
Lütfen [helptech@zytovision.com](mailto:helptech@zytovision.com) ile iletişime geçin  
Güvenlik ve performans özeti için lütfen bkz. [www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)



ZytoVision GmbH  
Fischkai 1  
27572 Bremerhaven/ Almanya  
Telefon numarası: +49 471 4832-300  
Faks: +49 471 4832-509  
[www.zytovision.com](http://www.zytovision.com)  
E-posta: [info@zytovision.com](mailto:info@zytovision.com)

**Ticari markalar:**

ZytoVision® ve ZytoFast®, ZytoVision GmbH'nin ticari markalarıdır.